

四 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94105878.6

1431公开日 1995年12月27日

[51]Int.Ci⁶ C12N 15/55

[22]申贈日 94.6.1

[71]申簿人 中国科学院生物物组研究所

地址 100101北京市朝阳区大屯路15号

[73]发明人 朱梅琴 晁 阳 赵玉凤 毕汝昌

1741专利代理机构 中科专利代理有限责任公司 代理人 王风华

C12N 9/56

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变及其 热稳定酶

157126 38

本发明提供了枯草杆菌碱性蛋白酶第 118 位上的 突变,第 118 位 门 冬 酰 鞍 被 纸 飯 敢 代, Asn(118)Scr, 突变后的基因表达产物是一种与天然枯草杆菌碱 草杆菌碱性蛋白酶不同的,耐热性较天然枯草杆菌碱 性蛋白酶高得多的蛋白酶,从而解决了天然碱性蛋白 酶工业应用上作为洗涤剂组分之一,在制草和清洗蛋白质一类污渍工业中加热最失活的缺陷。

14	5 55	: ac			
00000000000	Assassan			, 44	50
Scoreoreans			125025000000	587000006999	SMADINGSWEE SA
200000000000000000000000000000000000000	* CALLAGONOON	2002001	************	, year (\$9000)	45000000000
*****	Chooceanos	200000000000000000000000000000000000000	mostilitabili	**************************************	100.00 September 1
					40044000000 40044000000000000000000000
****	y versoonshoe.	3466.9003000	000000000000000000000000000000000000000	2002022222	MANAGE AND ADDRESS OF THE PARTY
ver an addition of the	44444900000	330023055	DOMESTICAL STATE OF THE PARTY O	20000000000000000000000000000000000000	AND COMPANY
OUCONOMICS.	100000000000000000000000000000000000000	70/X/W/WX	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	********	
ACMANDACEME.	accessobices/k	244238923495	*****************	POLOGO SANCE A	A
2002207277777	44044400C220C	4000,00000000	92,022,894974	\$9523555540E	3327233364
20000000000000000000000000000000000000	gryckorocasu	CONTRACTOR :	CC.26090202540	3,000,016,7990.	9800864746A
Accession of the	action with	636/632988988	100000000	\$5395859525	ASSESSED A
26534					~~~~

- 1. 枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变, 其特征是枯草杆菌 碱性蛋白酶第118位位点上门冬酰胺被丝氨酸取代: Asn(118)Ser;
- 2. 按权利要求1所述的枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变, 其特征在于突变后DNA序列为。

50 6 11 48 10 20 30 GTGAGAAGCA AAAATTGTG GATCAGCTTG TTGTTTGCGT TAACGTTAAT CTTTACGATG GCGTTCAGCA ACATGTCTGC GCAGGCTGCC GGAAAAAGCA GTACAGAAAA GAAATACATT GTTGGATTTA AACAGACAAT GAGTGCCATG AGTTCCGCCA AGAAAAAGGA TGTTATTTCT GAAAAAGGCG GAAAGGTTCA AAAGCAATTT AAGTATGTTA ACGCGGCCGC AGCAACATTG GATGAAAAAG CTGTAAAAGA ATTGAAAAAA GATCCGAGCG TTGCATATGT GGAAGAAGAT CATATTGCAC ATGAATATGC GCAATCTGTT CCTTATGGCA TTTCTCAAAT TAAAGCGCCG GETETTEACT CTCAAGGTTA CACAGGCTCT AACGTAAAAG TAGCTGTTAT CGACAGCGGA ATTGACTOTT CTCATCCTGA CTTAAACGTC AGAGGCGGAC GAAGCTTCGT ACCTTCTGAA ACAAACCEAT ACEAGGAEGG CAGITETEAE GGTAEGEATG TAGEEGGTAE GATTGEEGET CTTAATAACT CAATCEGTET TCTGGGCSTA CGGCCAAGCG CATCGTTATA TGCAGTAAAA GTGCTTGATT CAACAGGAAG CGGCCAATAT AGCTGGATTA TTAACGGCAT TGAGTGGGCC ATTICIAACA GIATGGATGI TATCAACAIG AGCCTTGGCG GACCTACTGG TICTACAGCG CTGAAAACAG TCGTTGACAA AGCCGTTTCC AGCGGTATCG TCGTTGCTGC CGCAGCCGGA AACGAAGGTT CATCOGGAAG CACAAGCACA GTOGGCTACO CTGCAAAATA TOOTTOTACT ATTGCAGTAG GTGCGGTAAA CAGCAGCAAC CAAAGAGCTT CATTCTCCAG CGCAGGTTCT GAGCTTGATG TGATGGCTCC TGGCGTGTCC ATCCAAAGCA CACTTCCTGG AGGCACTTAC GGCGCTTATA ACGGAACGTC CATGGCGACT CETCACGTTG CCGGAGCAGC AGCGTTAATT CTTTCTAAGC ACCCGACTTG GACAAACGCG CAAGTCCGTG ATCGTTTAGA AAGCACTGCA ACATATOTTO GAAACTOTTT CTACTAIGGA AAAGGGTTAA TCAACGTACA AGCAGCTGCA CAATAA

-

+

3.第118位突变的枯草杆菌碱性热稳定蛋白酶,其特征在于其氨基酸序列为:

AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGRSF
VPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVRPSASLYAVKVLDSTG
SGQYSWIINGIEWAISNSMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVA
AAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDVMA
PGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRDRL
ESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ

枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变及其热稳定酶

本发明涉及枯草杆菌碱性蛋白酶,特别是Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶第118位上的突变及由此产生的热稳定性高的蛋白酶。

枯草杆菌碱性蛋白酶属于丝氨酸酶,它水解蛋白质时对氨基酸种类的专一性较小,具有广谱性。作为洗涤剂的组份之一,已用于制革工业和清洗蛋白质一类的污渍。但是天然的碱性蛋白酶加热易失活,与漂白剂不能共存,影响了它的使用价值,国外对多种不同来源的碱性蛋白酶用基因工程和蛋白质工程手段进行了大量研究,得到了多种优良的突变种,其中有抗氧化的,耐热的,还有改变了表面电荷以改变与底物的相互作用而改良洗涤效果的突变种。在国内除了根据国外已有的报道在已知位点上作了某些定点突变外,还没有在未知位点上进行突变而得到性能改良的蛋白酶突变种。

丹麦诺沃公司的专利技术W08906279和W09100345分别描述了通过删除、取代或插入等方法、在枯草杆菌蛋白酶的单个或多个位点上,或进行氨基酸取代,或改变其表面电荷而得到不同位点的突变体,这些突变位点有第 6.9,11-12,19,25,36-38,53-59,67,71.89,111,115,120,121-122,124,128,131,140,153,154等。中国专利申请号为90108892.7提供了枯草杆菌蛋白酶第123位和274位点的突变体,但上述发

()

 \bigcirc

明没有说明这些突变体的具体性能。

本发明目的在于提供枯草杆菌碱性蛋白酶第 118位位点上的突变,在第118 位点上,118 位门冬酰胺被丝氨酸取代,即 Asn(118)Ser,这种突变后的基因表达产物是一种与天然蛋白酶不同的,耐热性较天然蛋白酶好得多的蛋白酶,从而解决了天然碱性蛋白酶工业应用上作为洗涤剂组份之一,在制革和清洗蛋白质一类污渍工业中加热易失活的缺陷。

本发明用 PCR方法对枯草杆菌碱性蛋白酶基因进行随机突变,筛选到一种突变体Asn(118)Ser,它比天然碱性蛋白酶具有好得多的耐热性,用已经测得的天然蛋白酶的晶体结构进行计算机模拟,发现在118位Ser通过水分子与邻近的氨基酸相互作用对蛋白酶分子结构起稳定作用。

下面结合附图,以选用 Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶基因作为 实施例,详细描述枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变及其突变 后热稳定酶的制得过程:

本发明选用Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶基因,包括上游调控区信号肽和导肽部分的基因片段为1.9Kb,1.9Kb的片段插入质粒PUC-19构成的重组质粒PY。本发明的蛋白质工程工作从PY质粒开始,从PY质粒中将1.9Kb片段切出,插到PBE-2穿梭质粒(生物工程学报7(3).224-229.1991. 郭兴华等)中,从而使碱性蛋白酶基因在枯草杆菌中得到表达。

1. 附图1为含枯草杆菌蛋白酶的重组质粒PBY, 其图中单线

部分为PBE-2 (生物工程学报7(3).224-229.1991. 郭兴华等) 载体,双线部分为蛋白酶基因片段,箭头表示蛋白酶基因方向, 附图2为质粒PUB或PUA构建示意图,附图3为PCR制备含突变的基 因片段示意图,附图4 为将含突变的基因片段插入含未经突变 的基因上遊部分的载体中示意图。

由图2知,将图1中所示的 PBY用Hind U酶解,得到(1),(2)两个片段,片段(1)是包含蛋白酶结构基因下游部分约 0.9Kb的片段,片段(2)是包含全部载体和蛋白酶基因上游部分约 7Kb片段,将片段(1)即0.9Kb片段插入PUC-18载体,由于插入方向不同而得到质粒PUA或PUB。片段(2)即7Kb的大片段称为PBY',留作以后步骤使用,即与PCR得到的 Hind III 片段连接以恢复蛋白的完整基因并构成表达质粒PBM;

- 2.由图3知,PUA或PUB作为PCR的模板,(3)为M3的通用测序 引物,两个引物一个正向,一个反向,通过PCR方法,经25个循环,每一个循环条件是93°C1分钟,52°C1分钟秒,70°C1分钟10秒,得到的PCR片段4,再用Hind**四**酶解,除去两头的引物部分,并经凝胶电脉纯化得到PCR扩增的Hind**口**片段(5);
- 3.由图4知,将上述得到的PCR扩增的Hind III 片段②、⑤插回到步骤2中的片段②即 7Kb的大片段也称PBY'中,得到重组表达质粒PBM,由于PCR有1/400的错误机率,所以此重组表达质粒 PBM是一混合物,有突变的,也有正常的,有插入方向相同的,也有插入方向相反的,插入方向相反的使基因失去功能,

有的突变种也能使基因失去功能,只有那些插入方向相同的重组质粒能表达正常的碱性蛋白酶,在这些正常的蛋白酶中有的活性提高了,有的降低了,有的具有耐热性,有的则与天然酶一样。将重组质粒混合物PBM转化DB104受体菌,在牛奶平板上进行筛选,没有透明圈的是插入方向相反的和突变使基因失活的重组质粒的转化子。那些有透明圈的即是含有正常蛋白酶基因的或虽含突变但却没使基因失活的重组质粒的转化子。将这些含透明圈的转化子再逐个培养,逐个测定它们分泌的碱性蛋白酶的相对活性和热稳定性。从中选得一热稳定性显著增加的突变种Asn(118)Ser。

4.选到的突变种经DNA 序列测定确定发生突变的核苷酸位置,从而知道哪个氨基酸发生了突变,附图5 为突变种和野生型基因在突变区附近的DNA序列,野生型是AAT,而突变种则是AGT,AAT是Asn的编码,AGT是Ser的编码,由图5知,突变种和野生型的DNA序列中仅有一个核苷酸的差别,A变为G。这一突变正好位于第118位Asn(门冬酰胺)的编码AAT中间的A,突变后的AGT变成了Ser(丝氨酸)的编码。所以本发明得到了在118位上突变了的碱性蛋白酶基因,这突变后的基因表达产物是一种与天然碱性蛋白酶不同的蛋白酶、它比天然酶具有好得多的耐热性,它将改善天然酶在工业和正常生活中的应用。附图6 为枯草杆菌碱性蛋白酶与枯草杆菌168碱性蛋白酶DNA序列比较示意图,图中带点处表示两者不同的地方。附图7为Ki2枯草杆菌碱性蛋

白酶与枯草杆菌168 碱性蛋的酶氨基酸序列的比较示意图,图中带点处表示两者不同的地方,附图10为突变后的Ki2枯草杆菌碱性蛋白酶DNA序列,附图11为第118位突变的枯草杆菌碱性热稳定蛋白酶的氨基酸序列;附图8为野生型蛋白酶和118位突变后的Asn(118)Ser蛋白酶活性比较示意图,图中曲线A表示野生型蛋白酶活性随温度变化而变化的曲线,曲线 B表示突变种Asn(118)Ser蛋白酶活性随温度变化而变化的曲线,由图中可以得出突变种Asn(118)Ser蛋白酶热稳定性比野生型蛋白酶好得多,60℃失活半衰期比天然酶长3倍。

附图9为突变后的蛋白酶局部结构的立体对,图中"·"表示水分子,由图9 知,Ser(118)通过水分子和另外两个氨基酸构建三对氢键,使分子结构趋于稳定,从而使其蛋白酶的热稳定性得以提高。

本发明揭示了枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的突变,以及突变后的表达产物是一种热稳定性比天然碱性蛋白酶好得多的蛋白酶,这种酶是一种热稳定酶,本发明适用于枯草杆菌碱性蛋白酶第118位的定点突变。

说明书附图

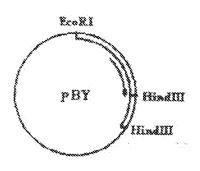


图 1

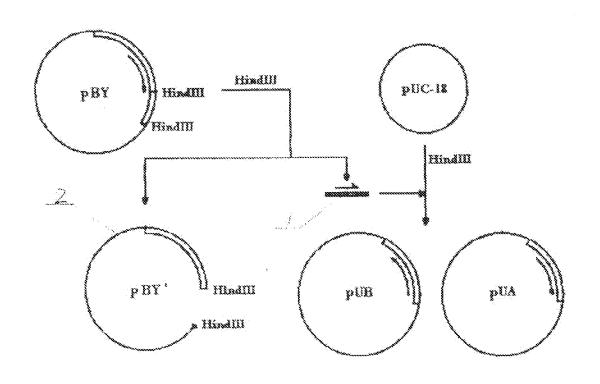
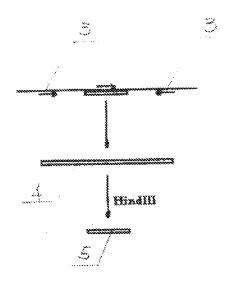
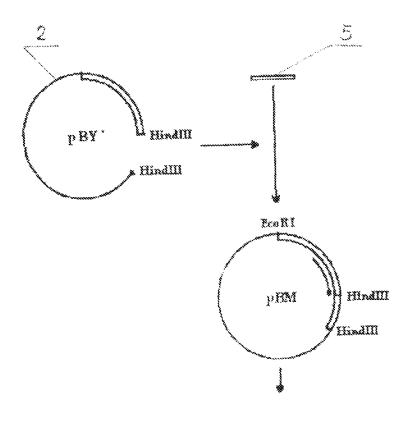


图2

V. (



3



II 4

mutant wild type

ACGTACGT

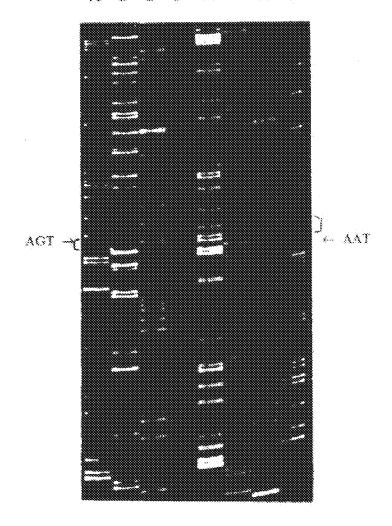


图5

1	10	20	30	40	50	23
168				TTGTTTGCGT	TAACGTTAAT	. 08 CTTTACGATG
ki2	GTGAGAAGCA	AAAAATTGTG	GATCAGCTTG	TTGTTTGCGT	TAACGTTAAT	CTTTACGATG
168	GCGTTCAGCA	ACERTATOR DE	antanamana	0000000000	GTACAGAAAA	23 3 3 00 X 22 X 000
k.i.2	GCGTTCAGCA	ACATGTCTGC	SCAGGCTGCC	GGAAAAAGCA	GTACAGAAAA	GAAATACATT
168	GTČGGATTTA	AACAGACAAT	GAGTGCCATG	AGTTCCGCCA	AGAAAAAGGA	مارات طبيعة لا شخيخة كويات
kiz	GTTGGATTTA	AACAGACAAT	GAGTGCCATG	AGTTCCGCCA	AGAAAAAGGA	TGTTATTTCT
168	GAAAAAGGCG	GAAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	202000000	AGCAACATTG
ki2	GAAAAAGGCG	GAAAGGTTCA	AAAGCAATTT	AAGTATGTTA	ACGCGGCCGC	AGCAACATTG
168	GATGAAAAAG	CTGTAAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATGT	GGAAGAAGAT
ki2	GATGAAAAAG	CTGTAAAAGA	ATTGAAAAAA	GATCCGAGCG	TTGCATATGT	CGAAGAAGAT
158	CATATTGCAC	ATGAATATGC	GCAATCTGTT	CCTTATGGCA	TTTCTCAAAT	TAAAGCGCCG
ki2	CATATTGCAC	ATGAATATGC	GCAATCTGTT	CCTTATGGCA	TTTCTCAAAT	TAAAGCGCCG
168	GCTCTTCACT	CTCAAGGCTA	CACAGGCTCT	AACGTAAAAG	TAGCTGTTAT	CGACAĞCGGA
ki2					TAGCTGTTAT	
168	ATTGACTCTT	CTCATCCTGA	CTTAAACGTC	AGAGGCGGAĞ	CAAGCTTCGT	ACCTTCTGAA
kiz					GAAGCTTCGT	
168	ACAAACCCAT	yccyeeycee	CAGTTCTCAC	GGTACGCATG	TAGCCGGTAC	GATTGCCGCT
ki2	ACAAACCCAT	ACCAGGACGG	CAGTTCTCAC	GGTACGCATG	TAGCCGGTAC	GATTGCCGCT
168	CTTAATAACT	esamocomer.	#WORKS CONTROL	* * *************	CATCATTATA	22222 C222 2 2 2 2
ki2	CTTAATAACT	CAATCGGTGT	#C#CCCCCC	COCCONNICE	CATCGTTATA	THUSINASAS.
158	GTGCTTGATT	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGGATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC
ki2	Greetteatt	CAACAGGAAG	CGGCCAATAT	AGCTGCATTA	TTAACGGCAT	TGAGTGGGCC
168 ki2	ATTTCCAACA	ATATCGATGT	TATCARCATG	AGCCTTGGCG	GACCTACTGG	TTCTACAGCG
		ATATGGATGT				TTCTACAGCG
168 ki2	CIGARARCAG	TCGTTGACAA	AGCCGTTTCC	AGCGGTATCG	restrected	CGCAGCCGGA
					TCGTTGCTGC	
168 ki2	ARCGREGIT	CATCCGGAAG	CACAAGCACA	GTCGGCTACC	CTGCAAAATA	TCCTTCTACT
					CTGCAAAATA	
158 %12	ATTUCACTAC	GTGCGGTAAA	CAGCAGCAAC	CAAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT
W. A. S.	V 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	4100001909	CAGCAGCAAC	CAAAGAGCTT	CATTCTCCAG	CGCAGGTTCT
168	GAGCTTGATG	TGATGGCTCC	Tescararea	ATCCAAACCA	apropressão	Accedemnac
ki2	CACCTTGATG	TGATGGCTCC	resecretee	ATCCAAAGCA	CACTTCCTGG	AGGCACTTAC
168	GCCGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGGGGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	AGCGTTAATT
ki2	GGCGCTTATA	ACGGAACGTC	CATGGCGACT	CCTCACGTTG	CCGGAGCAGC	AGCGTTAATT
168	CTTTCTAAGC	ACCCGACTTG	GACAAACGCG	CAAGTCCGTG	ATCGTTTAGA	AAGCACTGCA
Rí2	CTTTCTAAGC	ACCOGACTTG	GACAAAĆGCĞ	CAAGTCCGTG	ATCGTTTAGA	AAGCACTGCA
168	ACATATCTTG	GAAACTCTTT	CTACTATEGA	AAAGGGTTAA	TCAACGTACA	ACCARTECT
k.i.2	ACATATETTG	GAAACTCTTT	CTACTATGGA	AAAGGGTTAA	TCAACGTACA	AGCAGCTGCA
168	CAATAA					
Kiz	CAATAA					



MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQAAGKSSTEKKYIVGFKQTMSAMSSAKKKDVISEKGGKVQKQ MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQAAGKSSTEKKYIVGFKQTMSAMSSAKKKDVISEKGGKVQKQ FKYVNAAAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYAQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDS YSWIINGIEWAISNNMDVINMSLOGPTOSTALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPS FKYVNAAAATLDEKAVKELKKDPSVAYVEEDHIAHEYAQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDS gidsshpdlnvrggåsfvpsetnpyqdgsshgthvagtiaalnnsigvlgv§psaslyavkvldstgsgq GIDSSHPDLNVRGGRSFVPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVRPSASLYAVRVLDSTGSGQ YSWIINGIEWAISNNMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVAAAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPS TIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDVMAPGVS1QSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSNHPTWTN න ග ;;; ¥ 98 (C) 27 24 24 00 00 00 00 00 دی نیز کشر ... Θ Θ 27.72 2 2 2 2 3 3 4

TIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDVAAPGVSTQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALTLSKHPTWTN

AQVRDRLESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ AQVRDRLESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ

00 00 ن ا است الشائم

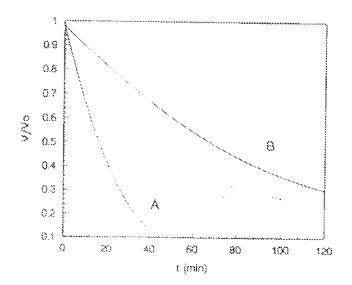


图8

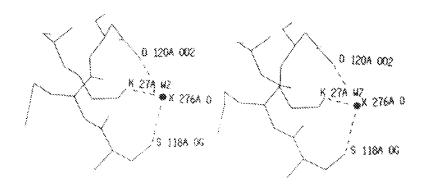


图9

GTGAGAAGCA GCGTTCAGCA GGCGCTTATA GAGCTTGATG ATTCCACTAC GTGCTTGATT ACABACCCAT ATTGACTCTT CATATTGCAC GATGAAAAAG GAAAAAGGGG GTTGGATTTA CTTTCTAAGC ATTTCCAACA CTTAATAACT GCTCTTCACT ACATATCTTG **MACCAAGGTT** CTGARARCAG AAAATTGTG GTATEGATET AACAGACAAT ACATGTCTGC GAAAGGTTCA GTGCGGTAAA CTCATCCTGA CTCAAGGTTA ATGARTATGC CTGTABAAGA ACGGAACGTC TGATGGCTCC TCGTTGACAA CAACAGGAAG CAATCGGTGT ACCAGGACGG ACCCGACTTG CATCCGGAAG GARACTCTTT ا د د GATCAGCTTG AAAGCAATTT GAGTGCCATG GCAGGCTGCC GCAMTCTGTT ATTGAAAAAA TOTGGGGGTA CTTAAACGTC CACAGGCTCT CTACTATEGA GACAAACGCG rescereree CAGCAGCAAC CACAAGCACA AGCCGTTTCC TATCAACATG CGGCCAATAT CAGTTCTCAC CATGGCGACT $\frac{\omega}{\circ}$ TTGTTTGCGT GGAAAAAGCA AAAGGGTTAA AAGTATGTTA AGTITCCGCCA CCTCACGTTG AGCCTTGGCG CCGCCAAGCC CCTACCCATC AGNGGCGGAC AACSTAAAAG CCTTATESCA GATCCGAGCG CAAGTCCGTG ATCCAAAGCA CAAAGAGCTT GTCGGCTACC AGCTGGATTA AGCGGTATCG 40 TAACGTTAAT GTACAGAAAA AGAAAAAGGA TCAACGTACA ATCGTTTAGA CATCGITTATA TAGCCGGTAC TTTCTCAAAT CACTIFICATION CATTCTCCAG CACCTACTGC GAAGCTTCGT TAGCTGTTAT TTGCATATGT Aceceaceac CCGGAGCAGC regracerse TTAACGGCAT CTGCAAAATA UI O CTTTACGATG GAAATACATT TGITATTTCI GGAAGAAGAT AAGCACTGC ACCGTTAATT AGGCACTTAC CGCAGGTTCT TCCTTCTACT TYCTACACC TOCAGTAAAA CATTCCCCCT ACCITCIGAA CGACAGCGGA TAAAGCGCCG AGCAACATTG ASCASCTSCA CGCAGCCGGA TOAGTGGGCC 0



CAATAA

AQSVPYGISQIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLNVRGGRSF
VPSETNPYQDGSSHGTHVAGTIAALNNSIGVLGVRPSASLYAVKVLDSTG
SGQYSWIINGIEWAISNSMDVINMSLGGPTGSTALKTVVDKAVSSGIVVA
AAAGNEGSSGSTSTVGYPAKYPSTIAVGAVNSSNQRASFSSAGSELDVMA
PGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPTWTNAQVRDRL
ESTATYLGNSFYYGKGLINVQAAAQ